

极大螺旋藻生物富钙作用的研究

郑江^{1,2} 高亚辉²⁽¹⁾集美大学水产学院, 省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021⁽²⁾厦门大学生命科学学院 厦门 361005

摘要 为开发一种新型功能食品——富钙螺旋藻, 分别以透析和直接添加两种方式向螺旋藻培养液中加入 CaCO_3 、 CaSO_4 以及贝壳等钙盐, 研究极大螺旋藻对钙的生物富集作用及在相应条件下的生长状况。结果表明: 两种培养方式下, 极大螺旋藻的生长情况尚好, 但或多或少受到一定程度的抑制, 尤其是直接加入 CaCO_3 和 CaSO_4 的螺旋藻。螺旋藻对钙的富集作用并不随培养液中游离钙离子浓度的增加而增加。添加的几种钙盐中, 直接加入 CaCO_3 和 CaSO_4 的螺旋藻钙含量高, 分别是对照的 14 倍和 23 倍, 其次是加入贝壳, 其钙含量是对照的 8~10 倍, 而采用透析方法加入 CaCO_3 和 CaSO_4 的螺旋藻, 其钙含量与对照相差无几, 甚至比对照还低。因此, 直接加入粉末状含钙化合物, 能提高螺旋藻对钙的亲和力, 强化其对钙的富集作用。

关键词 极大螺旋藻 钙 生物富集作用 生长

文章编号 1009-7848(2008)01-0022-05

钙是人体内重要的无机营养元素, 也是最易缺乏的元素^[1]。我国的大部分地区普遍存在缺钙现象^[2], 因此, 钙已成为强化食品中普遍添加的成分之一。尽管目前的补钙产品很多, 但有研究表明, 具有生物活性的天然螯合钙, 其效果要比单纯的补钙药物好^[3]。

螺旋藻是一种丝状多细胞原核藻类, 含有多种营养成分和活性物质, 是人类理想的食物及药物资源^[4], 但与其它成分相比, 天然螺旋藻的含钙量并不高^[5]。由于螺旋藻具有较强的生物吸附和富集能力, 本身又是良好的天然保健食品, 如能利用螺旋藻的富集同化作用来强化螺旋藻中的钙含量, 则对提升螺旋藻的品质具有重要意义。

螺旋藻对各类元素的富集作用已有不少报道, 如螺旋藻对硒和碘的富集^[6], 对锗的富集^[7], 对铜、铁、锰、锌等元素的富集^[8]。有关螺旋藻对钙的生物富集作用, 截止发稿前尚未见报道。

本文以极大螺旋藻为材料, 研究无机钙离子和不同固体含钙化合物对螺旋藻生长及富钙作用

的影响, 为富钙螺旋藻的开发、应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养液

极大螺旋藻 *Spirulina maxima* (Setch. et Gard.) Geitler, 厦门大学生命科学学院微藻实验室保存藻种。培养液, 简化的 Zarrouk 培养液^[9], 不含微量元素成分。

1.2 培养条件

将生长良好的极大螺旋藻藻液按 1:3 比例接种 25 mL 母液到 250 mL 锥形瓶中, 再加入 75 mL 简化的 Zarrouk 培养液, 构成 100 mL 藻液, 置于恒温箱中培养, 温度控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 8.0~10.0。培养光源为日光灯, 光照强度 4000 lx, 光照周期 L:D=12:12。每天振摇 3 次, 培养时间 7~8 d。

1.3 其它材料与仪器

绢筛(300目), 市售; 透析袋(直径 25 mm), 厦门锐思捷科学仪器有限公司提供; 其它试剂均为分析纯或色谱纯。

原子吸收光谱仪(AA800型), 美国 PE 公司; 数显电热鼓风干燥箱(101A-1型), 上海; 酸度计(PHC-2型), 上海; 数位照度计(TES-1334), 台湾泰仕公司。

收稿日期: 2007-02-28

基金项目: 福建省青年科技人才创新基金(No. 2001J035)

作者简介: 郑江, 男, 1971 年出生, 副教授

通讯作者: 高亚辉

1.4 试验方法

1.4.1 透析法添加培养液中的钙离子浓度

从同一母液中分别接种等量的藻种到 Zarrouk 培养液中,以其中一组为对照,试验组再分别以透析方式加入 CaCO_3 和 CaSO_4 ,以提高培养液中的钙离子浓度。每天测定 560 nm 处的光密度,7~8 d 后收获,测定藻细胞的干重和钙含量。

将 Zarrouk 培养基配方中的 CaCl_2 含量分别调整为 0.01、0.02、0.035、0.04、0.048、0.06 g/L,从同一母液中分别接种等量的藻种到其中,7~8 d 后收获,测定藻细胞的钙含量。

1.4.2 直接添加 CaCO_3 、 CaSO_4 和贝壳

从同一母液中分别接种等量的藻种到 Zarrouk 培养液中,以其中一组为对照,试验组再分别加入 0.6 g/L CaCO_3 、0.6 g/L CaSO_4 和贝壳,培养 7~8 d 后收获,测定藻细胞的干重和钙含量。

1.5 收获洗涤方法

对照组、贝壳及以透析方式添加钙盐进行富钙的藻细胞,用绢筛过滤后,再用蒸馏水冲洗数遍,收获,烘干后测定藻细胞的干重和钙含量。

直接加入固体粉末状 CaCO_3 、 CaSO_4 的,由于这些含钙固体粉末会沉积在藻细胞表面,干扰藻细胞钙含量的测定,因此先用绢筛过滤出藻细胞后,用 0.1 mol/L EDTA·4Na 冲洗数次(除去细胞表面黏附的 CaSO_4),再用 0.1 mol/L 醋酸冲洗数次(除去细胞表面黏附的 CaCO_3),最后用蒸馏水冲洗数遍,收获,烘干后即可测定藻细胞的干重和钙含量。

1.6 测定方法

1.6.1 干重的测定

收获、洗涤后,将藻细胞转移到已称重的滤纸片上(或小烧杯中),放在干燥箱中按文献[10]的方法烘干至恒重,称量滤纸片和藻细胞的总质量,扣除原滤纸片的质量即为藻细胞的干重。

1.6.2 钙含量的测定

湿法消化样品后,用原子吸收光谱法测定钙含量。

2 结果和讨论

2.1 透析法加入 CaCO_3 和 CaSO_4 对螺旋藻生长和钙含量的影响

采用透析法加入 CaCO_3 和 CaSO_4 ,提高了培

养液中的钙离子浓度,但对螺旋藻的干重并未产生太大影响,仅比对照略有下降;而在添加 CaCO_3 和 CaSO_4 后螺旋藻的钙含量却比对照中的钙含量还低,并未随溶液中钙离子浓度的增加而增加(见图 1)。此外,通过改变 Zarrouk 配方中的 CaCl_2 含量来改变培养液中的钙离子浓度,藻细胞中的钙含量也未随培养液中游离钙离子浓度的增加而明显地提高,只是在一定的范围内波动(见图 2)。说明在正常生理状态下,活体螺旋藻细胞对可溶性钙离子的生物富集作用不明显,游离态钙离子浓度的增加并不能促进螺旋藻细胞的生物富钙作用。

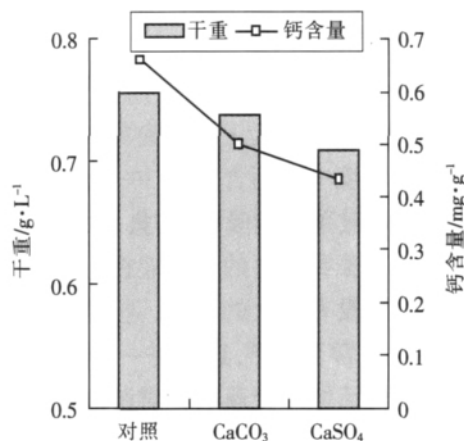


图 1 透析条件下添加 CaCO_3 和 CaSO_4 对螺旋藻生长和钙含量的影响

Fig.1 Effect of additive CaCO_3 and CaSO_4 in dialysis condition on the growth and calcium content of *S. maxima*

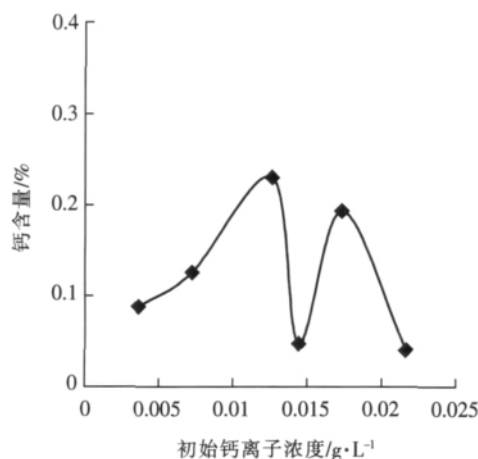


图 2 Zarrouk 培养液中初始钙离子浓度对螺旋藻钙含量的影响

Fig.2 Effect of the starting $[\text{Ca}^{2+}]$ in Zarrouk culture on the calcium content of *Spirulina*

有关螺旋藻的富集作用已有较多报道,多数研究都显示相应元素的富集量随环境中该元素的可溶性离子浓度的增加而增加,浓度达到某一值后,螺旋藻中的富集量达到最大值,再增加浓度则因生长不良或其它因素,富集效率逐步降低^[10-12]。但本研究结果表明,活体螺旋藻对钙的富集作用与对其它微量元素的富集作用有较大区别,并不随环境中钙离子浓度的增加而增加。李根保等^[13]报道,提高培养液中钙离子浓度可降低鱼腥藻膜的通透性;张宗申等^[14]和 Gong 等^[15]也发现用外源钙离子预处理,能够降低植物细胞质膜的通透性。由此看来,提高环境中的钙离子浓度,有可能导致螺旋藻细胞膜的通透性降低,从而不利于螺旋藻的生物富钙作用。

实际上,Zarrouk 培养液(对照)中的钙离子浓度已有较高水平,而真正被螺旋藻细胞吸收的钙量大约占到环境中总钙含量的3%~10%,大部分的钙离子并未被藻细胞吸收、富集。对藻类营养液的研究发现,藻类需要的营养液在组分上同高等植物的营养液没有多大的区别,特殊的是藻类对钙的需要量非常微小^[16],这也进一步证明了正常生理状态下的活体螺旋藻细胞对游离钙离子的生物富集作用是非常有限的。由于培养液中的 HCO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 HPO_4^{2-} 等离子都可与钙离子反应产生沉淀,所以培养液中游离钙离子浓度的提高也是有限的。当初始 $[\text{Ca}^{2+}]$ 达到0.025 g/L时就会产生沉淀,因此通过提高培养液中钙离子浓度的方法来强化螺旋藻的钙含量似乎不可行。

2.2 直接添加 CaCO_3 、 CaSO_4 和贝壳对螺旋藻的影响

如图3所示,直接添加 CaCO_3 、 CaSO_4 和贝壳后,螺旋藻的生长都受到一定程度的抑制,其中添加贝壳的受到的抑制较轻,添加 CaCO_3 、 CaSO_4 受到的抑制较重,但总体生长尚好。而藻细胞中的钙含量却与生长状况相反,生长最好的是对照,即钙含量最低(0.693 mg/g),而生长相对最差的 CaSO_4 中,细胞的钙含量最高(16.12 mg/g),说明螺旋藻对钙元素吸收、富集的同时,也对细胞的生长产生了抑制作用。

直接加入钙盐后,螺旋藻生长较差的原因可能有以下几个方面。(1)从藻类的营养需求来看,

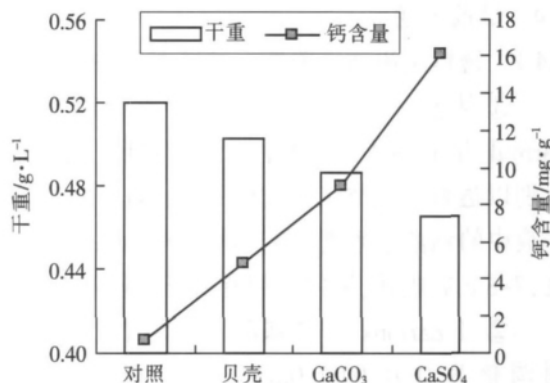


图3 直接添加 CaCO_3 、 CaSO_4 和贝壳对螺旋藻生长和钙含量的影响

Fig.3 Effect of direct additive CaCO_3 、 CaSO_4 and shell on the growth and calcium content of *S. maxima*

由于藻类对钙的需要量非常微小^[16],因此当藻细胞中的钙含量超过正常生理需要范围后,必然影响螺旋藻细胞的生理代谢过程,进而影响其生长。(2)从光合作用的角度看,由于直接加入 CaCO_3 、 CaSO_4 粉末后,培养液的浑浊度较高,影响螺旋藻对光的吸收,从而影响螺旋藻的光合作用,使其生长受到抑制。对于贝壳,虽然主要成分也是 CaCO_3 ,但其在溶液中并非以粉末的形式存在,会有一部分 CaCO_3 颗粒悬浮于溶液中,影响藻细胞对光的吸收,但该影响要远小于 CaCO_3 、 CaSO_4 粉末的影响,因而加贝壳的螺旋藻受到的生长抑制较轻。添加 CaCO_3 的培养液中细胞的干重比 CaSO_4 中的高,则可能是由于 CaCO_3 中的 CO_3^{2-} 对光合作用有促进作用,被藻细胞吸收后,弥补了部分因吸收光能不足所造成的生长抑制,而 CaSO_4 则无此特点。(3)从细胞壁的角度看,由于螺旋藻等藻类细胞壁的特殊性,使其能对许多离子有吸附作用^[17-18],但细胞壁又是细胞与外界进行物质交换的媒介,因而当细胞壁吸附过多的钙离子及其沉积物后,必然会影 响细胞与外界的物质交换,进而影响细胞的生长,使其生长受到抑制。另外,钙离子也是细胞内的一种信号物质,它在细胞的不同生理阶段,含量变化较大。作者发现螺旋藻细胞中的钙含量大致在0.05%~0.5%范围内波动。当细胞生长较好时,钙含量通常较低,而生长较差时,钙含量较高,这可能与细胞内部的信号调节有关。此外,原核细胞中还存在一种含钙的、能调节光合作

用的类钙调蛋白^[19],在生长较差时,该类蛋白的表量增加,这可能是细胞含钙量上升的一个原因。

比较图1和图3可知,螺旋藻对固体粉末状含钙化合物 CaCO_3 和 CaSO_4 的富钙效果明显好于对钙离子的富钙效果,钙含量分别是对照的14和23倍。陈小霞等^[17]认为藻类的生物富集过程一般可分为胞外结合、沉积和胞内吸收、转化2个步骤。具体富集途径有物理吸附、生物吸附、表面沉积、主动运输与被动扩散等,其中生物吸附和主动运输分别占总富集量的80%和20%。直接添加 CaCO_3 和 CaSO_4 等固体粉末后,在培养液中形成悬浮液。由于 CaCO_3 和 CaSO_4 等固体粉末为多孔状颗粒,对藻细胞也有较强的吸附作用,这样藻细胞和这些固体悬浮物相互吸附、相互沉积,大大加快、加强了生物富集过程中的“胞外结合、沉积”这一步骤,因此直接添加固体粉末的富钙效果明显好于游离态的钙离子。根据 Langmuir 吸附方程^[20]:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q^0} + \frac{1}{bQ^0 C}$$

式中, q_e ——单位质量的藻细胞对元素的吸附量; Q^0 ——在藻细胞表面形成单分子层的单位藻体质量的吸附量,即藻体的最大吸附量(g/g); b ——反映亲和力的吸附常数(L/mol); C ——平衡时该元素在环境中的浓度(mol/L)。

直接加入和透析加入,环境中的钙离子浓度 C 是相同的。这两种添加方式下螺旋藻对钙的最大吸附量 Q^0 也是相同的。直接添加方式下,钙含量 q_e 的增加是由于螺旋藻对钙的亲合力 b 的提高,此结果与上述分析是一致的。

3 结论

在螺旋藻的培养液中加入 CaCO_3 、 CaSO_4 及贝壳等钙盐,对螺旋藻的生长或多或少都会产生一定程度的抑制,尤其是以直接撒入方法加入的 CaCO_3 和 CaSO_4 ,对螺旋藻的生长产生较明显的抑制,但总体生长尚好。

螺旋藻对钙元素的富集明显不同于对其它元素的富集,藻细胞的钙含量并不随培养液中游离钙离子浓度的增加而增加,反而在一定程度上与螺旋藻的生长状况呈现一定的负相关性,且对固体粉末状含钙化合物(如 CaCO_3 和 CaSO_4)的富钙效果明显较好。这可能是由于直接添加固体粉末状含钙化合物后,提高了螺旋藻对钙的亲合力。添加的几种钙盐中,直接加入 CaCO_3 和 CaSO_4 的螺旋藻钙含量高,分别是对照的14倍和23倍,其次是加贝壳的钙含量,是对照的8~10倍,而采用透析法加入 CaCO_3 和 CaSO_4 ,其钙含量与对照相差无几,甚至还比对照低。

参 考 文 献

1. 王立安, 赵俊霞. 钙对细胞骨架的调控及其在生命活动中的重要作用 [J]. 生物学杂志, 1999, 16 (4): 6~7.
2. 陈如松, 尹协瑜, 冀绍伟. 中国正常成年人体内的钙含量 [J]. 辐射防护通讯, 1999, 19 (2): 6~8.
3. 朱珠, 郭镭, 杨超, 等. 高浓度钙生物液的研究 [J]. 食品工业科技, 1994, (3): 49~52.
4. Claudio S. Mass production of *Spirulina* [J]. *Experientia*, 1982, 38: 40~43.
5. 曹吉祥, 胡泽斌. 强化螺旋藻钙含量的初步研究 [J]. 水产学报, 1996, 20 (1): 65~67.
6. Mosulishvili L M, Kirkesali E I, Belokobylsky A I, et al. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine- containing pharmaceuticals based on blue- green algae *Spirulina platensis* [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30: 87~97.
7. 王大志, 高亚辉. 两种培养温度下钝顶螺旋藻吸收累积锗的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (6): 646~651.
8. 李日强, 王翠红, 席玉英, 等. 钝顶螺旋藻对五种元素生物富集作用的研究 [J]. 山西大学学报 (自然科学版), 2001, 24 (2): 167~169.
9. 胡鸿均, 郑怡, 陈启发. 螺旋藻——养殖原理·技术·应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
10. 杨心宁, 高亚辉, 王大志, 等. 利用螺旋藻富集碘的实验 [J]. 台湾海峡, 2002, 21 (1): 109~113.
11. 李志勇, 李元广, 郭祀远, 等. 钝顶螺旋藻生物富集 Cr () 影响因素的研究 [J]. 生物工程学报, 2000, 16 (1):

- 108~112.
12. 黄峙, 向军俭, 郑文杰. 钝顶螺旋藻富集转化硒及硒在藻体中的分布 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (1): 12~14.
 13. 李根保, 王高鸿, 李敦海, 等. 外源 Ca^{2+} 对模拟微重力环境中鱼腥藻细胞质膜透性和光合特性的影响 [J]. 水生生物学报, 2003, 27 (2): 136~139.
 14. 张宗申, 利容千, 王建波. 外源 Ca^{2+} 处理对高温胁迫下辣椒叶片细胞膜透性和 GSH、AsA 含量及 Ca^{2+} 分布的影响 [J]. 植物生态学报, 2002, 25 (2): 230~234.
 15. Gong M, Li Y J, Dai X, et al. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings [J]. Journal of Plant Physiology, 1997, 150: 615~621.
 16. 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 60.
 17. 陈小霞, 吴振强, 梁世中. 微藻对微量元素的生物富集及其机理的探讨 [J]. 食品与发酵工业, 1999, 25 (4): 56~60.
 18. Savvaidis I. Recovery of gold from thiourea solutions using microorganisms [J]. BioMetals, 1998, 11: 145~151.
 19. 张蔚文. 原核生物中的类钙调蛋白 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22: 98~10.
 20. Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum [J]. J. Amer. Chem. Soc., 1918, 40: 1361~1403.

Studies on Calcium Bioaccumulation of *Spirulina Maxima*

Zheng Jiang^{1,2} Gao Yahui²

(¹Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fujian Province University, Xiamen 361021

²School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract In order to develop a new kind of function food, the growth and calcium bioaccumulation of *Spirulina maxima* were studied in the present paper by adding CaCO_3 , CaSO_4 and shell into Zarrouk culture by dialysis and direct addition methods respectively. The results showed that growth of *S. maxima* was not too bad, although it was inhibited to some extent, especially those of *S. maxima* directly added CaCO_3 , CaSO_4 . Calcium bioaccumulation of *S. maxima* was not strengthened with the $[\text{Ca}^{2+}]$ increasing in culture, but enhanced much more when directly adding calcium compound such as CaCO_3 and CaSO_4 into the culture. The highest calcium contents in *S. maxima* were about 14 and 23 times as high as control respectively when directly adding CaCO_3 and CaSO_4 into the culture. The second high calcium content was about 8~10 times as high as control when adding shell into the culture. When adding CaCO_3 and CaSO_4 into the culture by dialysis, the calcium contents were almost as high as control, even less than the control. Conclusion: direct adding method could increase *Spirulina* affinity to calcium, therefore improve calcium bioaccumulation of *S. maxima*.

Key words *Spirulina maxima* Calcium Bioaccumulation Growth